

## QUANTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DE DIFERENTES COMBUSTÍVEIS

DANTAS, Fabiana Gomes da Silva<sup>\*</sup>; BRABES, Kelly Cristina da Silva<sup>\*\*</sup>;  
TEODÓSIO, Tiara Kesli Conticelli<sup>\*\*\*</sup>; PAULA, Suéllen Machado de<sup>\*\*\*\*</sup>; NEGRÃO, Fábio Juliano<sup>\*\*\*\*\*</sup>;  
ORTOLANI, Laís Gonçalves<sup>\*\*\*\*\*</sup>; SPÓSITO, Juliana Vivian<sup>\*\*\*\*\*</sup>

### Resumo

Em razão da sua capacidade de adaptação e reprodução em um pequeno intervalo de tempo, os microrganismos apresentam a característica de se desenvolver em ambientes com condições aparentemente inóspitas, como os combustíveis. Uma vez no interior dos sistemas de armazenamento de combustíveis, os microrganismos podem permanecer dispersos na suspensão ou aderidos na superfície sob a forma de biofilme, podendo ocasionar diversos prejuízos à indústria e ao meio ambiente. Neste estudo foram quantificados os contaminantes microbianos presentes em diferentes combustíveis da região de Dourados, MS: gasolina comum, gasolina aditivada, *diesel*, etanol e biodiesel. Foram utilizados dois métodos de quantificação, o Método do Número Mais Provável (NMP) e densidade de células por espectrofotometria. Entre os combustíveis analisados, o *diesel* (4,58 Log NMP/mL e 2,28 DO<sub>630</sub>) e o biodiesel (3,32 Log NMP/mL e DO<sub>630</sub> 0,41) apresentaram maior densidade microbiana, e o etanol (2,84 NMP/mL e 0,27 DO<sub>630</sub>), menor densidade. Esses resultados reforçam as evidências de que os combustíveis apresentam uma concentração microbiana elevada, podendo induzir e/ou acelerar processos de biocorrosão nos tanques de combustíveis.

**Palavras-chave:** Combustíveis. Microrganismos. Método do número mais provável. Densidade óptica.

<sup>\*</sup> Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal da Grande Dourados; Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso; Caixa Postal 322, 79825-070, Dourados, MS; fabianasilva@ufgd.edu.br

<sup>\*\*</sup> Professora na Universidade Federal da Grande Dourados; kellybrabes@ufgd.edu.br

<sup>\*\*\*</sup> Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal da Grande Dourados; tiarateodosio@yahoo.com.br

<sup>\*\*\*\*</sup> Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal da Grande Dourados; suellepaula@ufgd.edu.br

<sup>\*\*\*\*\*</sup> Professor na Universidade Federal da Grande Dourados; fabionegrao@ufgd.edu.br

<sup>\*\*\*\*\*</sup> Mestranda em Ciências da Saúde pela Universidade Federal da Grande Dourados; la\_ortolani@hotmail.com

<sup>\*\*\*\*\*</sup> Mestranda em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal da Grande Dourados; juliana\_sposito@hotmail.com

## *Measurement of different fuels microbiota*

### *Abstract*

*Microorganisms due to their high capacity for adaptation and reproduction in a small amount of time have the characteristic to develop in environments with seemingly inhospitable conditions, such as the fuels. Once inside the system for storage of fuels, the microorganisms may remain dispersed in the suspension or adhered on the surface in the form of biofilm, which can cause several damages to the industry and the environment. Therefore, this study aimed to quantify microbial contaminants present in different fuels, regular gasoline, premium gasoline, diesel, ethanol and biodiesel in the region of Dourados, MS. For the evaluation of the microbiota, we used two quantification methods, the Method of Most Probable Number (MPN) and spectrophotometry in Elisa reader. Among the fuels studied, we found that diesel (4,58 Log NMP/mL e 2,28 DO<sub>630</sub>) and biodiesel (3,32 Log NMP/mL e DO<sub>630</sub> 0,41) showed high microbial density and ethanol (2,84 NMP/mL e 0,27 DO<sub>630</sub>) showed low density of microorganisms. These results demonstrated that fuels have an elevated microbial concentration, which may cause and/or accelerate processes of bio corrosion in fuel tanks.*

*Keywords: Fuels. Microorganisms. Method of Most Probable Number. Optical density.*

## 1 INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana nos combustíveis tem sido relatada há algumas décadas; os primeiros trabalhos que evidenciaram os efeitos nocivos dessa contaminação foram realizados com combustíveis de aeronaves na década de 1930. Porém, estes trabalhos somente passaram a ser publicados a partir da década de 1960 (RAIKOS et al., 2011).

Apesar de os combustíveis aparentarem ser um ambiente inóspito para a sobrevivência dos microrganismos, vários são os fatores que contribuem para o crescimento microbiano nesses sistemas, como: disponibilidade de nutrientes, presença de água e de aditivos, condições favoráveis de pH e temperatura (YEMASHOVA et al., 2007; VIDELA; HERRERA, 2005; GAYLARDE; BENTO; KELLEY, 1999).

Os microrganismos podem entrar em contato com os combustíveis de diferentes formas: durante o processo de refino; por meio do solo no período de estocagem; durante a lavagem dos dutos que veiculam os combustíveis, ou transportados com poeira e água mediante as aberturas nos tanques (YEMASHOVA et al., 2007; GAYLARDE; BENTO; KELLEY, 1999). No interior dos tanques de combustíveis os microrganismos podem permanecer aderidos na superfície, formando biofilme, e/ou dispersos no fluido.

A microbiota presente nos sistemas de armazenamento de combustíveis provoca um aumento na quantidade de água livre, em razão da degradação dos hidrocarbonetos, e a atividade metabólica dos microrganismos leva à formação de peróxido e ácido. A presença de microrganismos também provoca aumento da viscosidade, diminuição da estabilidade térmica e volatilidade, que podem levar a problemas de filtração, deterioração do equipamento e, conseqüentemente, perda da qualidade do

produto final (KARTAVTSEVA et al., 1989; YEMASHOVA et al., 2007). Para crescer nesse ambiente, os microrganismos exigem a capacidade de, metabolicamente, transformar os hidrocarbonetos, com a finalidade de empregá-los como fonte de carbono e energia (YEMASHOVA et al., 2007).

Entre as bactérias, fungos filamentosos e leveduras capazes de crescer em combustível, destacam-se os gêneros: *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Aeromonas* sp., *Achromobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Cladosporium* sp., *Clostridium* sp., *Corynebacterium* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Moraxella* sp., *Nocardia* sp., *Pasteurella* sp., *Pseudomonas* sp., *Ochrobactrum* sp. e *Rhodococcus* sp. (CHAO et al., 2010; YEMASHOVA et al., 2007; EMTIAZI et al., 2005; GAYLARDE; BENTO; KELLEY, 1999).

Portanto, a presença de microrganismos nos combustíveis, na forma de biofilme ou dispersos na suspensão, pode ocasionar diversos prejuízos na indústria e contribuir para o rompimento dos tanques. Face ao exposto, esta pesquisa teve por objetivo quantificar a microbiota de diferentes combustíveis (gasolina comum, gasolina aditivada, diesel, etanol e biodiesel).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizadas três coletas de gasolina comum, gasolina aditivada, *diesel* e etanol em três postos de combustíveis, totalizando nove amostras de cada tipo de combustível. Também foram analisadas 10 amostras de biodiesel de extração e conversão industrial, provenientes de uma planta produtora de biodiesel, localizada na cidade de Dourados, MS.

### 2.1 QUANTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DOS COMBUSTÍVEIS DE ORIGEM FÓSSIL E BIOCOMBUSTÍVEIS

A microbiota foi mensurada em cada uma das amostras por dois métodos: Método do Número Mais Provável (NMP) e densidade óptica (DO) por espectrofotometria, utilizando-se leitor automático do tipo Elisa.

Para a realização do método do NMP, procedeu-se a diluição seriada das amostras até  $10^{-5}$  e, a partir destas, foram retiradas alíquotas de 1mL e inoculadas em uma série de três tubos de ensaio contendo Caldo Infusão de Cérebro e Coração – BHI (HImedia<sup>®</sup>), os quais foram incubados a  $35 \pm 2$  °C por 48 horas. A densidade bacteriana foi calculada pela tabela de Hoskins (1934) e expressa em NMP/mL. Os tubos foram considerados positivos quando apresentaram crescimento e/ou produção de gás.

Com o propósito de complementar os resultados do método do NMP, foram realizadas leituras de densidade óptica em tempo real em um espectrofotômetro automático tipo Elisa (Thermoplate<sup>®</sup>). Para tanto, uma alíquota de 200 µL de cada tubo utilizado no método do NMP foi colocada nas microplacas de fundo chato com 96 poços, para posterior leitura da  $DO_{630}$ .

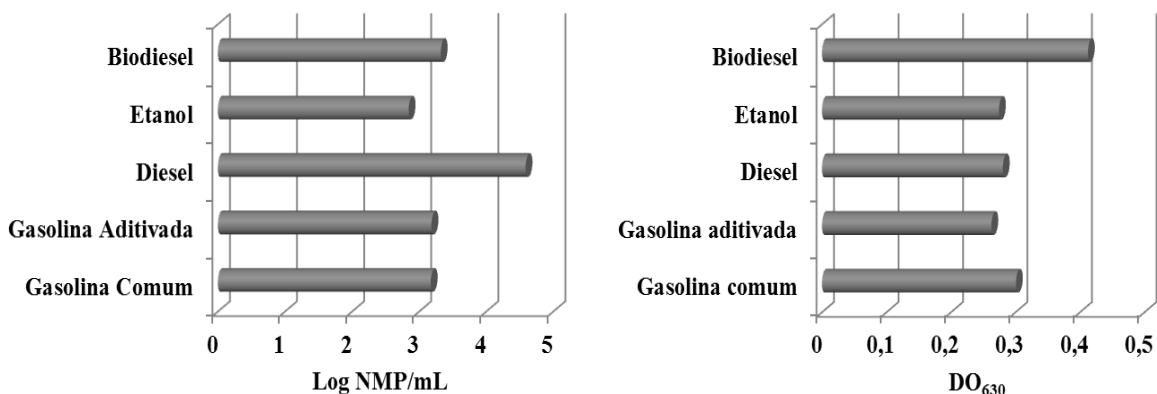
## 2.2 AVALIAÇÃO DO PH E TURBIDEZ DOS COMBUSTÍVEIS DE ORIGEM FÓSSIL E BIOCOMBUSTÍVEIS

As análises de pH foram realizadas com um aparelho pHmetro (Hanna<sup>®</sup>), exceto das amostras de biodiesel, analisadas com fita de pH. A turbidez foi mensurada por meio de um aparelho turbidímetro (Instrutherm<sup>®</sup>).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

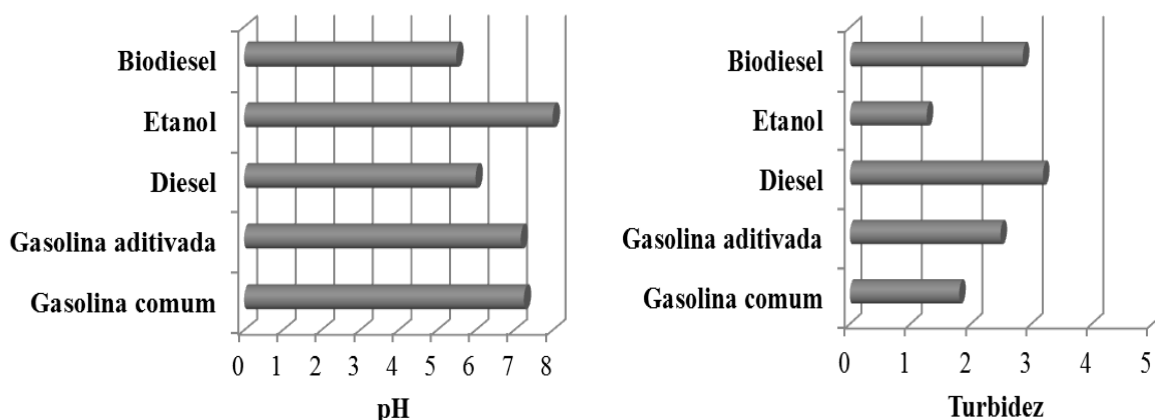
Face aos resultados das duas técnicas, verificou-se que o *diesel* (4,58 Log NMP/mL e 2,28 DO<sub>630</sub>) e o biodiesel (3,32 Log NMP/mL e DO<sub>630</sub> 0,41) apresentaram maior densidade microbiana. O etanol (2,84 NMP/mL e 0,27 DO<sub>630</sub>) foi o combustível com menor quantificação de microbiota (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Quantificação da microbiota de gasolina comum e aditivada, *diesel*, etanol e biodiesel, pelo método do Número Mais Provável (Log NMP/mL) e densidade óptica (DO<sub>630</sub>)



Fonte: os autores.

As condições de pH e turbidez são fatores limitantes que podem favorecer o crescimento microbiano. Pode-se observar que as amostras de etanol (8,04) apresentaram os valores mais altos de pH (pH básico) e as amostras de *diesel* (6,00) e biodiesel (5,5), os valores mais baixos. As amostras de *diesel* (3,19 UNT) e biodiesel (2,86 UNT) também se apresentaram mais túrbidas em relação às amostras de etanol (1,27 UNT) (Gráfico 2). Frente a esses dados, pode-se afirmar que os resultados das análises de pH e turbidez possuem relação direta com a avaliação da microbiota, uma vez que o *diesel* e o biodiesel apresentaram pH levemente ácido e maior densidade de microrganismos.

Gráfico 2 – Medidas de pH e turbidez (UNT) dos combustíveis: gasolina comum, gasolina aditivada, *diesel*, etanol e biodiesel

Fonte: os autores.

Esse padrão microbiológico é condizente com os resultados apresentados por Rodríguez-Rodríguez, Rodríguez-Cavallini e Blanco (2009) em um estudo similar realizado com *diesel*, gasolina e querosene de quatro distribuidoras da região da Costa Rica, no qual verificou-se uma maior contagem microbiana nas amostras de *diesel*. Estes resultados também foram relatados por Bento e Gaylarde (2001) e Gaylarde, Bento e Kelly (1999) em estudos realizados com os combustíveis no Brasil.

Segundo Gaylarde, Bento e Kelley (1999), tais resultados podem ser explicados pelo fato de o *diesel* possuir uma maior quantidade e variedade de aditivos em relação aos outros combustíveis. Estes aditivos constituem fonte de micronutrientes e carbono para os microrganismos, além de facilitarem o acesso dos hidrocarbonetos aos microrganismos (LEAHY; COLWELL, 1990).

Lutterbach et al. (2009), em um estudo realizado no Laboratório de Biorrosão e Biodegradação (Labio) do Instituto Nacional de Tecnologia (INT), também constaram uma elevada microbiota nesse combustível, esta constitui-se de 99-100% de bactérias anaeróbias.

Outro fator que tem sido evidenciado como fonte de biodegradabilidade do *diesel* é a adição de biodiesel a esse combustível, aumentando, assim, a formação de biomassa microbiana na interface óleo/água (BÜCKER et al., 2011), uma vez que a partir de 01 de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil passou a ter adição de 5% de biodiesel. Esse percentual de adição foi aprovado pela Resolução n. 6/2009, do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE).

Apesar de o etanol ter apresentado a menor contagem microbiana em relação aos outros combustíveis, alguns estudos revelam que ele também favorece o crescimento microbiano, por possuir uma alta solubilidade, além de enzimas constitutivas que, associadas às rotas metabólicas dos microrganismos, degradam o etanol (POWERS et al., 2001; ALVAREZ; HUNT, 2002).

Os dois tipos de gasolina analisados (comum e aditivada) também apresentaram expressiva contagem microbiana. Pode-se sugerir que a gasolina aditivada apresentou maior contagem em relação

à gasolina comum em razão da presença de mais aditivos, como acontece com o *diesel*, além de uma maior quantidade de álcool que garante, assim, uma maior solubilidade.

A capacidade de biodegradação dos hidrocarbonetos deve-se, segundo Leahy e Colwell (1990), a três mecanismos inter-relacionados: indução e/ou repressão de enzimas específicas, mudanças genéticas que resultam na aquisição de novas atividades metabólicas e seleção de cepas capazes de transformar tais compostos.

Assim, os hidrocarbonetos podem ser inativos, inibidores ou estimulantes para os microrganismos, servindo como única fonte de matéria orgânica para o desenvolvimento de seus processos vitais.

#### 4 CONCLUSÃO

Verificou-se que o *diesel* e o biodiesel apresentaram maior concentração microbiana e que os valores de turbidez e pH se relacionam diretamente com a microbiota dos combustíveis.

Os resultados obtidos sugerem que os combustíveis apresentam características favoráveis para o desenvolvimento microbiano, fato este que merece destaque, uma vez que os microrganismos podem provocar diversos impactos nas indústrias e nos sistemas de armazenamento dos combustíveis.

#### REFERÊNCIAS

ALVAREZ, P. J. J.; HUNT, C. S. The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 2, n. 44, p. 83-104, 2002.

BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **Biodeterioração e Biodegradação Internacional**, v. 47, n. 2, p. 107-112, 2001.

BÜCKER, F. et al. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **Biodeterioração e Biodegradação Internacional**, v. 65, n. 1, p. 172-178, 2011.

CHAO, Y. et al. Isolation and characterization of bacteria from engine sludge generated from biodiesel-diesel blends. **Fuel**, v. 89, n. 11, p. 3358-3364, 2010.

EMTIAZI, G. et al. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* sp and transformed *Escherichia coli*. **Jornal Africano de Biotecnologia**, v. 4, n. 2, p. 172-176, 2005.

GAYLARDE, C. C.; BENTO, F. M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 1-10, 1999.

HOSKINS, J. K. Most probable numbers for evaluation of Coli aerogenes test by fermentation tub method. **Public Health Reports**, v. 49, n. 12, p. 393-405, 1934.

- KARTAVTSEVA, Z. M. et al. Destruction of diesel fuel by microorganisms in circulating systems. **Mikrobiol Zh**, v. 51, n. 4, p. 87-93, 1989.
- LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 3, n. 54, p. 305-315, 1990.
- LUTTERBACH, M. T. S. et al. Diversidade microbiana em amostras de biodiesel. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 25., 2009, Porto de Galinhas. **Anais...** Porto de Galinhas, 2009.
- POWERS, S. E. et al. The Transport and Fate of Ethanol and BTEX in Groundwater Contaminated by Gasohol. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 79-123, 2001.
- RAIKOS, V. et al. Identification and characterization of microbial contaminants isolated from stored aviation fuels by DNA sequencing and restriction fragment length analysis of a PCR-amplified region of the 16S rRNA gene. **Fuel**, v. 90, n. 2, p. 695-700, 2011.
- RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; RODRÍGUEZ-CAVALLINI, E.; BLANCO, R. Bacterial contamination of automotive fuels in a tropical region: the case of Costa Rica. **Revista de Biologia Tropical**, v. 57, n. 3, p. 489-504, 2009.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. **Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 142 p.
- VIDELA, H. A.; HERRERA, L. K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. **International Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 169-180, 2005.
- YEMASHOVA, N. A. et al. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 6, n. 4, p. 315-337, 2007.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), por possibilitar a realização das análises, à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro.

Recebido em 28 de junho de 2013  
Aceito em 13 de janeiro de 2014

